

## بررسی ایمونوفنوتایپینگ لنفوسیت‌های T ارتشاح یافته به تومور (TIL) در بیماران مبتلا به سرطان پستان

دکتر داور امانی<sup>۱</sup>، دکتر زهیر محمد حسن<sup>۲</sup>، دکتر مجتبی کریم زاده<sup>۳</sup>، صادق فیض اله زاده<sup>۳</sup>،  
دکتر محمد حسین دهقان<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> نویسنده مسئول، استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، E-mail: amanid@sums.ac.ir  
<sup>۲</sup> استاد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران  
<sup>۳</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران  
<sup>۴</sup> دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

### چکیده

**زمینه و هدف:** لنفوسیت‌های ارتشاح یافته به تومور (Tumor Infiltrating Lymphocytes) TILs عامل شناسایی و دفاع بر علیه سلول‌های توموری بدخیم توسط سیستم ایمنی میزبان بوده و سلول‌های T، بیشترین سلول‌های ایمنی ارتشاح یافته به داخل تومور هستند. اطلاعات متناقضی درباره سلول‌های T داخل تومور وجود دارد و مکانیسم‌های متعددی برای توضیح ناکارایی TILs پیشنهاد شده است. هدف این مطالعه بررسی وضعیت ایمنی لنفوسیت‌های T ارتشاح یافته به بافت تومور در سرطان پستان انسان می‌باشد.

**روش کار:** از ۱۶ زن مبتلا به سرطان پستان بیوپسی گرفته شد. بررسی‌های پاتولوژیک و بافت شناسی نشان دادند که در ۱۳ نمونه نوع تومور کارسینوم مجرای مهاجم (Invasive Ductal Carcinoma) IDC است. نمونه‌های بافتی بیماران و گروه کنترل، برای آنالیز بوسیله فلوسیتومتری آماده شدند.

**یافته‌ها:** نتایج این بررسی نشان داد که سرطان پستان انسان دارای مقادیر متفاوت و متغیری TILs است. در مورد درصد سلول‌های داخل توموری با فنوتیپ CD45<sup>+</sup>، CD3<sup>+</sup>، CD3<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> در بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی داری یافت نشد. همچنین تفاوت معنی داری در مورد ارتشاح و وضعیت فعالیت زیرجمعیت سلول‌های T مابین بیماران سرطانی و گروه کنترل وجود نداشت. سلول‌های CD4<sup>+</sup> در بیماران IDC و سلول‌های CD8<sup>+</sup> در بیماران با تومورهای نوع دیگر (ILC Invasive Lobular Carcinoma) و (Atypical Medullary Carcinoma) AMC عمده‌ترین لنفوسیت‌های ارتشاح یافته به داخل تومور بودند. سلول‌های TCD8<sup>+</sup> داخل توموری مارکر HLA-DR را بیشتر از CD25 بعنوان مارکر فعالیت، بیان می‌کنند.

**نتیجه گیری:** در این مطالعه ارتباطی بین میزان TILs و اندازه و همچنین مراحل بالینی تومور یافت نشد. سلول‌های ایمنی در بیشتر سرطان‌های پستان به داخل بافت تومور ارتشاح می‌یابند. همچنین با در نظر گرفتن بیان مارکرهای فعالیت، این سلول‌ها تا حدودی فعال شده هستند. درک مکانیسم‌های سرکوب سیستم ایمنی توسط سلول‌های سرطانی ممکن است اطلاعات مهمی در مورد راه‌های فراتومور و همچنین پیشرفت استراتژی‌های ضد سرطان بدست دهد.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان پستان، لنفوسیت‌های ارتشاح یافته به تومور، سلول‌های T

پذیرش: ۸۵/۱۰/۷

دریافت: ۸۵/۶/۱۱

### مقدمه

نقص پاسخ‌های ایمنی رخ می‌دهد. اما مکانیسم‌های ایجاد این اختلالات ایمنی بطور کامل درک نشده است [۱].

کارسینومای مجرای مهاجم (IDC)<sup>۱</sup> شایع‌ترین نوع سرطان پستان در ایران است. در بیشتر بیماران سرطانی

<sup>۱</sup> Invasive Ductal Carcinoma

لنفوسیت های ارتشاح یافته به داخل تومور که عمدتاً شامل سلولهای T هستند به سادگی در تئوپلاسم های مختلف قابل تشخیص هستند [۲]. ایمنی سلولی نقش مهمی در ایمنی بر علیه سلولهای سرطانی بازی می کند و ارزیابی کمی آن بوسیله اندازه گیری نسبت لنفوسیتهای  $TCD4+$  و  $TCD8+$  صورت می گیرد. با پیشرفت تومور نسبت لنفوسیتهای  $CD4+$  در خون محیطی بیماران سرطانی کاهش می یابد و این تغییر بایش آگهی بد بیماری مرتبط است [۳-۵]. اختلال در ایمنی سلولی می تواند مرتبط با تغییر در نسبت این سلولها باشد.

در مایعات بدخیم پلورال تعداد سلول های  $TCD8+$  بطور معنی داری کمتر از تعداد سلول های  $TCD4+$  است [۶-۹]. برعکس نسبت سلولهای  $CD4+$  در حفره پلورال بیماران سرطان ریه بدون بدخیمی، بطور معنی داری کمتر از سلولهای  $CD8+$  است [۱۰، ۱۱].

مکانیسم های مختلفی برای ناکارآمدی TILs بر علیه سلول های سرطان پیشنهاد شده است. در ایمنوتراپی برخی از سرطان ها نظیر ملانوما با فعال کردن TILs نتایج سودمندی حاصل شده است [۱۲]. اختلالات عملکردی TILs به غیر طبیعی بودن مولکولهای سیگنال دهنده نسبت داده شده است، هر چند اطلاعات ضد و نقیضی در این رابطه وجود دارد [۱۵، ۱۴].

مرگ TILs در تومورهای مختلف به مکانیسم هایی نظیر القا بیان ملکولهای  $RCAS1$ ،  $PD-1$ ،  $FasL$  و مرگ سلولی در اثر فعالیت  $AICD$ <sup>۱</sup> نسبت داده می شود که تمامی این مکانیسم ها توسط سلول های سرطانی القا می شود [۱۶، ۱۲]. استفاده از مدل های حیوانی برای مطالعه TILs نشان داده است که اختلال پاسخ های ایمنی در اثر تومور نه تنها در نتیجه مکانیسم های آنژری کلونی، بلکه در نتیجه تحلیل و یا حذف سلول های ایمنی می باشد. علاوه بر این، بی پاسخی

ایمنولوژیک را می توان تا حدودی به ورود سلولهای T تنظیم کننده به محل تومور نسبت داد [۱۷]. نقص سیگنالینگ IL-2 را که نقش مرکزی در فعال شدن سلول T را دارد، می توان به فعالیت آنزیماتیک متالوپروتئینازهای ماتریکس مشتق از سرطان نسبت داد. سرانجام القا بیان ژن IDO (آنزیم مهم در سرکوب پاسخ ایمنی در حاملگی) توسط سلولهای سرطانی ممکن است نقش مهمی در سرکوب ایمنی بازی کند [۱۸]. آشکار شدن مکانیسمهای نقص عملکردی TILs در تومورها نه تنها به پیشرفت درمان موفق تومور کمک می کند، بلکه می تواند به درک مکانیزم های ناشناخته سیستم ایمنی در مواجهه با بدخیمی بیانجامد.

هدف این تحقیق، تعیین درصد لنفوسیت های  $TCD4+$  و  $TCD8+$  ارتشاح یافته به بافت سرطان پستان (در مراحل مختلف بالینی) بوسیله فلوسیتومتری بود. تعیین میزان فعالیت این سلولها در مراحل بالینی تومور و مقایسه میزان ارتشاح TILs در کارسینوم مجرای مهاجم (شایعترین نوع سرطان پستان در ایران) با انواع دیگر سرطان پستان اهداف دیگر این مطالعه بودند.

## روش کار

۱۶ بیمار مبتلا به سرطان پستان که در انستیتو سرطان بیمارستان امام خمینی تهران تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند وارد این مطالعه شده و از آنها بیوپسی تومور گرفته شد. بیمارانی که سابقه شیمی درمانی و یا پرتو درمانی داشتند از مطالعه حذف شدند. سن بیماران بین ۳۷ تا ۹۰ سال متغیر بود. عمل جراحی انجام شده رادیکال ماستکتومی بود. در ۱۳ بیمار (۸۱/۲۵٪) از بیماران مبتلا، نوع تومور کارسینوم مجرای مهاجم (IDC)، و در سه بیمار مبتلا، نوع تومور کارسینومای مهاجم لوبولار (ILC)<sup>۲</sup> (دو بیمار ۱۲/۵٪) و کارسینومای مدولاری آتپیک (AMC)<sup>۳</sup> (یک بیمار ۶/۲۵٪) تشخیص داده شد. همچنین در سه بیمار نوع

<sup>۲</sup> Invasive Lobular Carcinoma

<sup>۳</sup> Atypic Medullary Carcinoma

<sup>۱</sup> Activity Induced Cell Death

تومور خوش خیم گزارش گردید که بعنوان کنترل در نظر گرفته شدند. از کلیه بیماران رضایت نامه جهت شرکت در مطالعه اخذ گردید.

پارافورمالدئید فیکس شده و دردمای ۸-۲ درجه سانتی گراد و در تاریکی به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد [۲۰،۱۹].

### تهیه سوسپانسیون سلولهای T

نمونه های بیوپسی تومور، داخل لوله های استریل حاوی محیط کشت و روی یخ جهت کارهای بعدی به آزمایشگاه ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انتقال یافتند. بیوپسی تومورهای سفت انسان توسط فورسپس واسکالپل به تکه های کوچک بریده شدند. قطعات بافتی دوبار با بفرسفات شسته شده، سپس ۵ میلی لیتر از آنزیم Cocktail (۵ mg/ml) به Collagenase و ۰/۰۲ mg/ml (DANase) به مجموعه اضافه شد و مخلوط آن به مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سوسپانسیون حاصله از توری استیلی ۱۵۰ میکرونی عبور داده شد. سوسپانسیون سلول های منفرد بدست آمده دو بار شسته شده و با آنتی بادی منوکلونال نشاندار شدند [۲۰،۱۹].

### آنالیز فلوسیتومتری

پس از انجام مراحل فوق نمونه ها جهت آنالیز به آزمایشگاه ایمنوژنتیک دانشکده پزشکی تهران منتقل شدند. نمونه های سلولی با فلوسیتومتر کولتر با ترکیب فیلترهای متوالی اندازه گیری شد. بررسی بر روی نواحی لنفویید با پراکنش قدامی (Forward Scatter) و جانبی (Side Scatter) انجام شد. سلولهای با رنگ آمیزی دو گانه با استفاده از نرم افزار کولتر بررسی شدند.

جهت بررسی آماری نتایج بدست آمده از آزمونهای آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون غیرپارامتریک کروسکال-والیس با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. با سطح اطمینان ۹۵٪ سطح احتمال قابل قبول برای تمامی آزمونهای آماری ۵٪ ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد.

### ایمونوفنوتایپینگ

آنتی بادی های مونوکلونال فلورسنت DAKO, Denmark برای تشخیص لکوسیتها و TILs در سوسپانسیون سلولی تومور استفاده گردیدند. anti-CD45 برای تعیین لکوسیتها، anti-CD3/CD45 برای تعیین لنفوسیت های T و anti-CD45/CD4 و anti-CD45/CD8 به ترتیب برای تعیین لنفوسیت های T کمکی و لنفوسیت های T سیتوتوکسیک استفاده گردیدند. همچنین دو آنتی بادی مونوکلونال دیگر؛ آنتی CD25 و آنتی HLA-DR برای تعیین TILs فعال شده استفاده شدند. در این مطالعه ۱۰۰  $\mu$ l از هر نمونه با ۱۰  $\mu$ l از هر آنتی بادی منوکلنل که بطور مستقیم با فلوئورسئین ایزوتیوسیانات<sup>۱</sup> یا آر-فیکواریترین<sup>۲</sup> کونژوگه بودند، رنگ آمیزی شدند. سپس هر نمونه با

### یافته ها

درصد لنفوسیتهای T و لکوسیتهای ارتشاح یافته به تومور در بیماران سرطان پستان به منظور تخمین درصد لکوسیت ها و لنفوسیتها در بیماران مبتلا به بدخیمی و تومور و گروه تومور خوش خیم، شانزده بیمار به سه گروه تقسیم شدند و پروتکل جدول شماره ۱ استفاده شد.

تمامی داده ها در ناحیه (Gate) لنفوسیت و لکوسیت محاسبه شدند. در بیماران IDC متوسط درصد سلول های ارتشاح یافته، دارای فنوتیپ CD3+، CD45+ و CD3+CD45+ به ترتیب ۳۲/۵، ۲۰/۹ و ۵۹/۷ بودند. آنالیز آماری تفاوت معنی داری در درصد سلول های CD45+ (لکوسیت ها) و سلول های CD3+CD45+ (لنفوسیت های T) بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل نشان نداد (جدول ۱ و شکل ۱).

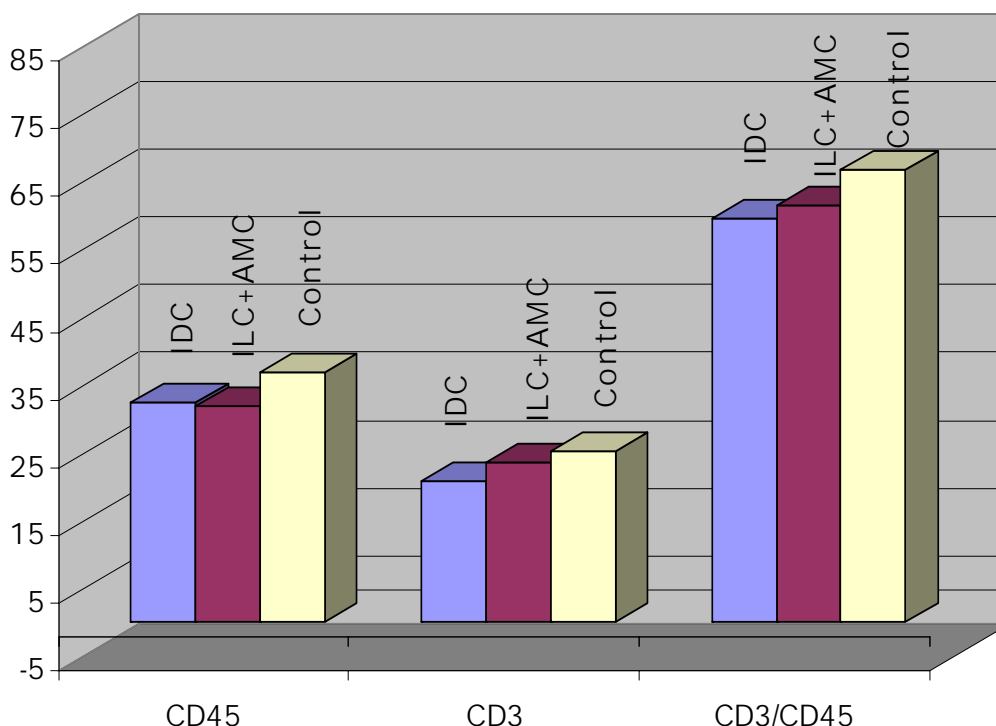
<sup>۱</sup> FITC

<sup>۲</sup> RPE

جدول ۱. مقایسه درصد لکوسیت ها و لنفوسیت های T داخل تومور در بیماران سرطان پستان و گروه کنترل

P Value	Group 3 Benign/control N=3	Group 2 ILC+AMC patients N=3	Group 1 IDC patients N=13	Marker
۰/۹۵	۳۷	۳۲	۳۲/۵	CD45 <sup>+</sup>
۰/۹۶	۲۵/۳	۳۲/۷	۲۰/۹	CD3 <sup>+</sup>
۰/۸۵	۶۶/۸	۶۱/۷	۵۹/۷	CD3 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup>

IDC: Invasive Ductal Carcinoma ILC: Invasive Lobular Carcinoma AMC: Atypic Medullary Carcinoma



شکل ۱. مقایسه درصد لکوسیت ها و لنفوسیت های T داخل تومور در بیماران سرطان پستان و گروه کنترل

Group 1: IDC patients    Group 2: ILC+AMC patients    Group 3: Control  
 IDC: Invasive Ductal Carcinoma    ILC: Invasive Lobular Carcinoma    AMC: Atypic Medullary Carcinoma

بررسی زیرجمعیت های لنفوسیت های T داخل تومور در بیماران با سرطان پستان به منظور ارزیابی درصد وضعیت فعالیت این سلول های با استفاده از پروتکل جدول شماره ۲ انجام شد. تمامی نتایج در ناحیه (Gate) لکوسیت ها ارزیابی شدند. همانطوریکه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است، اختلاف معنی داری بین بیماران سرطانی

(گروه ۱ و ۲) و گروه کنترل در مورد ارتشاح و وضعیت فعالیت زیر جمعیت های لنفوسیت های T کمکی (سیتوتوکسیک) وجود ندارد. سلول های T کمکی (۷/۷٪) در بیماران IDC و سلول های T سیتوتوکسیک (۱۰/۳٪) در بیماران مبتلا به سایر تومورها (ILC+AMC) به ترتیب بیشترین سلول های ارتشاح یافته بودند.

سلول های  $CD8^+$  ارتشاح یافته به تومور، مارکر فعالیت دیررس (HLA-DR) را بیشتر از مارکر فعالیت زودرس ( $CD25$ ) بیان می کردند.

ارتباط بین TILs و اندازه های مختلف کارسینوم مجرای میهایم (IDC) به منظور ارزیابی ارتباط بین درصد TILs و اندازه تومور، سیزده بیمار IDC ارزیابی شدند. همانطوریکه در جدول شماره ۳ آمده است، درصد وضعیت فعالیت زیر جمعیت های مختلف TILs، در اندازه های مختلف تومور اختلاف معنی داری نداشتند.

اما در بیشتر سلول های بررسی شده، کاهش درصد TILs با افزایش اندازه تومور مشاهده شد (جدول ۳). سلول های  $CD4^+/CD8^+$  و  $CD8^+CD25^+/CD8^+$  بطور قابل توجهی در تومورهای با اندازه  $\leq 3$  cm -۲ افزایش یافته بودند. ارتباط بین TILs و مراحل بالینی کارسینومای مجرای میهایم همانطوریکه در جدول ۴ خلاصه شده، اختلاف معنی داری بین درصد وضعیت فعالیت TILs در مراحل مختلف بالینی کارسینومای میهایم مجرای وجود ندارد. همچنین تعداد لنفوسیت های T سیتو توکسیک که مارکر فعالیت دیررس (HLA-DR) را بیان می کنند بطور قابل ملاحظه ای با پیشرفت تومور افزایش می یابد اما این افزایش از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ۴).

## بحث

در تومورهای انسانی تعداد متغییری از لکوسیت ها، خاصه ماکروفاژها و لنفوسیت ها، ارتشاح می یابند. اکثر لنفوسیت های ارتشاح یافته به تومور (TILs) سلول های  $CD3^+$  T هستند. سلول های NK و لنفوسیت B در بافت های نئوپلاستیک اغلب خیلی کم هستند و یا اصلا حضور ندارند [۲۲،۲۱].

میزان ارتشاح و وضعیت ایمنولوژیک ماکروفاژها و سلول های NK همراه تومور در سرطان پستان انسان در مطالعاتی توسط نویسندگان مورد بررسی قرار گرفته اند [۲۰،۱۹]. همچنین بر اساس نتایج بدست آمده و منتشر نشده توسط محققین و گزارش سایر محققین،

سلول های B ارتشاح یافته به تومور نادر هستند [۲۴،۲۳،۲۱].

دربارخی از تومورهای ایمنولوژیک، TILs نسبت بیشتری از سلول های عملکردی<sup>۱</sup> را شامل می شود که به طور اختصاصی سلول های توموری را شناسایی می کنند [۲۶،۲۵].

اختصاصی بودن TILs نسبت به توموری که به آن ارتشاح می یابند بیانگر آنست که سلول های توموری، آنتی ژن های بیان می کنند که ایمنولوژیک هستند. جانکر<sup>۲</sup> و همکارانش معتقدند که حضور سلول های T افکتور فعال شده در بافت توموری همیشه به این مفهوم نیست که پاسخ ایمنی اختصاصی رخ داده است [۲۷].

در این مطالعه لکوسیت های ارتشاح یافته به تومور بیشتر سلول های  $CD3^+$  بودند (۳/۲۰٪ سوسپانسیون سلول توموری). با اینکه روش های مختلفی در آزمایشگاه های مختلف جهت بررسی TILs بکاربرده شده است ولی نتایج ما، یافته های دیگران را تایید می کند [۲۹،۲۸].

در مورد زیر جمعیت های لنفوسیت T، نتایج این مطالعه نشان داد که سلول های  $CD4^+$  TCD4 (کمکی) و  $CD8^+$  (سیتو توکسیک) تقریباً بطور مساوی در داخل توده توموری بیماران کارسینوم مجرای میهایم (IDC) یافت می شوند (جدول شماره ۲).

در حالیکه در بیماران مبتلا به انواع دیگر سرطان پستان (AMC و ILC)، لنفوسیت های  $CD8^+$  سلول های غالب هستند. نتایج بدست آمده توسط محققین دیگر در این مورد متناقض می باشد. در بیشتر این گزارشات نشان داده شده است که در سرطان پستان انسان، سلول های غالب ارتشاح یافته به بافت تومور، سلول های T کمکی هستند [۳۱،۳۰،۲۴].

در حالیکه دیگر محققین معتقدند که زیر جمعیت غالب TILs سلول های T سیتو توکسیک هستند [۳۲،۲۹،۲۸].

<sup>1</sup> Effector

<sup>2</sup> Jonker

جدول ۲. مقایسه وضعیت ایمنولوژیک زیر جمعیت های مختلف لنفوسیت های T داخل تومور در بیماران سرطان پستان و گروه کنترل

P Value	Group 3 Benign/control N=3	Group 2 ILC+AMC patients N=3	Group 1 IDC patients N=13	Marker
<b>T Cytotoxic</b>				
۰/۳	۴/۵	۱۰/۳	۶/۵۲	CD8 <sup>+</sup>
۰/۶	۳۳/۲	۳۶/۹	۴۴/۵	CD8 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>
۰/۹	۴۷	۶۷	۵۲/۳	CD8 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
۰/۶	۹/۳	۱۱/۴	۱۰/۴	CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> / CD8 <sup>++</sup>
۰/۹	۲۹/۲	۳۴/۷	۳۳	CD8 <sup>+</sup> HLA-DR / CD8 <sup>+</sup> *
<b>T Helper**</b>				
۰/۴	۳	۲/۷	۷/۷	CD4 <sup>+</sup>
۰/۹	۴۵/۶	۲۵/۷	۴۵	CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>
۰/۹	۵۵	۴۲/۵	۵۷/۲	CD4 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>

\* the expression of activation markers( CD25 and HLA-DR) on intratumor TCD8<sup>+</sup> cells were significantly different(p=0.001) by T test.

\*\* in the case of helper T lymphocytes the activation status were not studied because of technical problems  
IDC: Invasive Ductal Carcinoma ILC: Invasive Lobular Carcinoma AMC: Atypic Medullary Carcinoma

جدول ۳. مقایسه وضعیت ایمنی TILs در بیماران کارسینوم مجرای مهاجم در اندازه های مختلف تومور

P Value	<2 cm	2-3cm	> 3 cm	Marker
<b>T Cytotoxic</b>				
۰/۳	۲/۷	۶/۵	۱۰/۵	CD8 <sup>+</sup>
۰/۶	۳۹	۳۷/۵	۵۹/۵	CD8 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>
۰/۹	۴۸/۳	۵۰	۵۹/۲	CD8 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
۰/۶	۹/۲	۱۴/۹	۵/۴	CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> / CD8 <sup>++</sup>
۰/۹	۳۰/۲	۳۱/۴	۳۸	CD8 <sup>+</sup> HLA-DR / CD8 <sup>+</sup> *
<b>T Helper**</b>				
۰/۴	۲/۷	۳/۷	۴/۴	CD4 <sup>+</sup>
۰/۹	۴۲/۳	۴۷/۹	۴۴/۹	CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>
۰/۹	۵۱/۷	۶۴/۸	۵۵/۶	CD4 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>

\* the minimum number of cases in each group was three

جدول ۴. مقایسه وضعیت ایمنی TILs در بیماران کارسینوم مجرای مهاجم در مراحل مختلف بالینی تومور

P Value	III	II	I	Marker
<b>T Cytotoxic</b>				
۰/۵	۵/۷	۱۱/۴	۶/۵	CD8 <sup>+</sup>
۰/۹	۳۷/۷	۳۷/۸	۴۶/۷	CD8 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>
۰/۷	۴۳/۶	۶۳	۵۵/۱	CD8 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
۰/۴	۹/۸	۵/۸	۵/۷	CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> / CD8 <sup>++</sup>
۰/۳	۴۱/۴	۲۹/۸	۲۷	CD8 <sup>+</sup> HLA-DR / CD8 <sup>+</sup> *
<b>T Helper**</b>				
۰/۹	۳/۱	۳	۴	CD4 <sup>+</sup>
۰/۹	۴۲/۱	۴۲/۱	۴۸/۲	CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>
۰/۹	۵۶/۴	۵۵/۴	۵۴/۸	CD4 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>

\* the minimum number of cases in each clinical stage was three

جورجیانوس<sup>۱</sup> و همکارانش در یک مطالعه با روش ایمنوهیستو کیمیکال نشان دادند که بین میزان ارتشاح TILs و زیر جمعیت غالب لنفوسیت های T در داخل تومور ارتباط وجود دارد. به طوریکه در تومورهای با ارتشاح متوسط TIL، احتمال غالب بودن سلولهای T کمکی وجود دارد، در حالیکه با افزایش تعداد TILs، کاهش در نسبت سلول های T کمکی به همراه افزایش نسبت سلولهای T سیتوتوکسیک مشاهده می شود [۳۳]. لذا پیشنهاد شده است که لنفوسیت های TCD4+ ارتشاح یافته به تومور، نقش مهمی در استقرار و بقای لنفوسیت های TCD8+ اختصاصی در محل تومور دارد [۳۴].

بخشی از این نتایج متضاد را می توان به اندازه نمونه تومور و همچنین روش های متفاوتی که در آزمایشگاه های مختلف برای بررسی این سلولها استفاده شده است، نسبت داد.

نتایج این تحقیق نشان داد که لنفوسیت های T سیتوتوکسیک ارتشاح یافته به بافت تومور هر دومارکر فعالیت سلولهای T یعنی CD25 (مارکر فعالیت اخیر) و HLA-DR (مارکر فعالیت دیررس) را بیان می کنند، اما میزان بیان HLA-DR نسبت به CD25 بطور معنی داری بیشتر است (P=0,001) (جدول ۲). این یافته ها مطابق با نتایج وایت فورد<sup>۲</sup> و همکارانش است [۲۸].

همچنین این گروه نشان دادند که میزان بیان HLA-DR در سلول های CD8+ نسبت به CD4+ بیشتر است. در تحقیق حاضر، ما به دلیل مشکلات تکنیکی نتوانستیم وضعیت فعالیت سلول های T کمکی داخل تومور را بررسی کنیم. بررسی های قبلی TILs را از نظر فنوتیپی بعنوان سلولی که مارکرهای فعالیت مزمن (D69+ HLA-DR+) را در سطح خود دارند، معرفی می کنند [۳۵، ۳۶].

در یک بررسی دانشمندان نشان دادند که سلولهای کارسینوم مدولاری در مقایسه با سلولهای کارسینوما مجرای میزان بیشتری HLA-DR بیان می کنند [۳۶].

نتایج این تحقیق نشان داد بین ارتشاح TILs و اندازه های مختلف تومور و همچنین مراحل بالینی تومور در بیماران کارسینوم مجرای مهاجم اختلاف معنی داری وجود ندارد. همانطوریکه در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

ارتشاح سلول های CD8+/CD8+HLADR+ با پیشرفت تومورافزایش می یابد (در مرحله یک ۲۷٪ و در مرحله سه ۴۱/۴٪). این یافته ها برایمونوزنستی تومور و نقش ضدسرطانی لنفوسیت های T سیتوتوکسیک تاکید دارد اما پیشرفت مراحل بالینی تومور نشان میدهد که این سلولها از نظر ایمونولوژیکی سرکوب شده اند. همچنین در این مطالعه ما نتوانستیم ارتباطی بین میزان ارتشاح زیر جمعیت های مختلف TILs با سن و تعداد گره لنفی در گیر بیماران پیدا کنیم (داده های منتشر نشده محققین)، در صورتیکه قبلا در یک مطالعه ارتباط معنی داری بین میزان ارتشاح TILs و تعداد گره های لنفی در گیر بدست آمده است [۳۳].

در دو گزارش اخیر ما ارتباط معنی داری در مورد ماکروفاژهای همراه تومور (TAM)<sup>۳</sup> [۲۱] و سلولهای NK [۲۲] ارتشاح یافته به تومور بین بیماران سرطان پستان و گروه کنترل پیدا نکردیم.

### نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تعداد متفاوتی از سلول های T فعال شده مخصوصا سلول های T سیتوتوکسیک به سرطان پستان انسان ارتشاح می یابند. چون درصد TILs فعال شده با پیشرفت بالینی تومورافزایش می یابد، به نظر می رسد که این سلولها سرکوب شده باشند. درک مکانیسم های مقاومت و یا مهارکنندگی سلول های توموری در برابر پاسخ ایمنی ممکن است کمک شایانی به شناسائی مکانیسم های فرار تومور و همچنین پیشرفت استراتژیهای درمان سرطان نماید.

<sup>1</sup> Georgiannos

<sup>2</sup> Whitford

<sup>3</sup> Tumor Assonated Macrophage

**تقدیر و تشکر**

بخاطر تهیه نمونه های سرطان پستان و همچنین

از آقای دکتر پاکزاد کمال تشکر را دارند.

این کار از نظر مالی بوسیله دانشگاه تربیت مدرس

تهران حمایت شد. نویسندگان از آقای دکتر عطری

**References**

- 1-Remedi MM, Hliba E, Demarchi M, Depiante-Depaoli M. Relationship between immune state and tumor growth rate in rats bearing progressive and non-progressive mammary tumors. *Cancer Immunol Immunother.* 1998; 46:350-4.
- 2- Van Ravenswaay Claasen HH, Kluin PM, Fleuren GJ. Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity. *Lab Invest.* 1992;67:166-74.
- 3- Gemignani M, Maiman M, Fruchter RG, Arrastia CD, Gibbon D, Ellison T. CD4 lymphocytes in women with invasive and pre-invasive cervical neoplasia. *Gynecol Oncol.* 1995;59:364-9.
- 4- Greenstein A, Pecht M, Kaver I, Trainin N, Braf Z. Characterization of peripheral blood T-cell subpopulation of bladder cancer patients. *Urol Res.* 1991;19:219-22.
- 5- Kaver I, Pecht M, Trainin N, Greenstein A, Braf Z. T lymphocyte subsets and function in the peripheral blood of patients with urological cancer. *Oncology.* 1992;49:108-13.
- 6- Lucivero G, Pierucci G, Bonomo L. Lymphocyte subsets in peripheral blood and pleural fluid. *Eur Respir J.* 1988; 1: 337-40.
- 7- Inoue Y, Shijubo N, Uede T. Induction of killer cells from lymphocytes in pleural effusion of advanced lung cancer patients. *Jpn J Cancer Res.* 1990; 81: 1012-20
- 8- Albera C, Mabritto I, Ghio P, Scagliotti GV, Pozzi E. Lymphocyte subpopulations analysis in pleural fluid and peripheral blood in patients with lymphocytic pleural effusions. *Respiration.* 1991;58:65-71.
- 9- Yanagawa H, Sone S, Nii A, Fukuta K, Nakanishi M, Maeda K, et al. Ogura T. Lymphokine-activated killer induction and its regulation by macrophages in malignant pleural effusions. *Jpn J Cancer Res.* 1989;80:1220-7.
- 10- Takahashi K, Sone S, Kimura S, Ogura T, Monden Y. Phenotypes and lymphokine-activated killer activity of pleural cavity lymphocytes of lung cancer patients without malignant effusion. *Chest.* 1993 ;103:1732-8.
- 11- Takahashi K, Sone S, Saito S, Kamamura Y, Uyama T, Ogura T, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments lymphokine-activated killer activity from pleural cavity mononuclear cells of lung cancer patients without malignant effusion. *Jpn J Cancer Res.* 1995; 86: 861-6.
- 12- Chiou SH, Sheu BC, Chang WC, Huang SC, Hong-Nereng H. Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies. *J Reprod Immunol.* 2005; 67: 35-50.
- 13- Nakagomi H, Petersson M, Magnusson I, Juhlin, C, Matsuda, M, Mellstedt, H, et al. Decreased expression of the signal-transducing chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1993; 53: 5610-12.
- 14- Matsuda, M., Petersson, M., Lenke, R., Taupin, J.-L., Magnusson, I., Mellstedt, H., et al. Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. *Int. J. Cancer.* 1995; 61: 765-72.
- 15- Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside TL. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 3137-45.
- 16- Ioachim HL, Decuseara R, Giancotti F, Dorsett BH. FAS and FAS-L expression by tumor cells and lymphocytes in breast carcinomas and their lymph node metastases. *Pathol Res Pract.* 2005;200:743-51.
- 17- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004 ;5:266-71.



- 18- Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer*. 2002;101:151-5.
- 19- Amani D, Hassan ZM, Ravangard F, Farazmand S, Karim-Zadeh M. Flowcytometric Analysis of Tumor Associated Macrophages in Invasive Ductal Carcinoma of Breast. *Iranian J Immunology*. 2005; 2:117-22.
- 20- Farazmand S, Amani D, Hassan ZM. Investigation of NK cell population in Peripheral Blood and Tumor Lesions of Patients with Breast Cancer. *Iranian J Immunology*. 2005; 2:152-57.
- 21- Wong PY, Staren ED, Tereshkova N, Braun DP. Functional analysis of tumor-infiltrating leukocytes in breast cancer patients. *J Surg Res*. 1998;76:95-103.
- 22- Zhang XD, Schiller GD, Gill PG, Coventry BJ. Lymphoid cell infiltration during breast cancer growth: a syngeneic rat model. *Immunol Cell Biol*. 1998;76:550-5.
- 23- von Kleist S, Berling J, Bohle W, Wittekind C. Immunohistological analysis of lymphocyte subpopulations infiltrating breast carcinomas and benign lesions. *Int J Cancer*. 1987 ;40:18-23.
- 24- Underwood JC, Giri DD, Rooney N, Lonsdale R. Immunophenotype of the lymphoid cell infiltrates in breast carcinomas of low estrogen receptor content. *Br J Cancer*. 1987;56:744-6.
- 25- Whiteside TL, Jost LM, Herberman RB. Tumor-infiltrating lymphocytes. Potential and limitations to their use for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1992;12:25-47.
- 26- Melief CJ. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res*. 1992;58:143-75.
- 27- Joncker NT, Marloie MA, Chernysheva A, Lonchay C, Cuff S, Klijanienko J. et al. Antigen-independent accumulation of activated effector/memory T lymphocytes into human and murine tumors. *Int J Cancer*. 2006;118:1205-14.
- 28- Whitford P, Mallon EA, George WD, Campbell AM. Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Br J Cancer*. 1990;62:971-5.
- 29- Bilik R, Mor C, Hazaz B, Moroz C. Characterization of T-lymphocyte subpopulations infiltrating primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 1989;28:143-7.
- 30- Gottlinger HG, Rieber P, Gokel JM, Lohe KJ, Riethmuller G. Infiltrating mononuclear cells in human breast carcinoma: predominance of T4+ monocytic cells in the tumor stroma. *Int J Cancer*. 1985;35:199-205.
- 31- Ben-Ezra J, Sheibani K. Antigenic phenotype of the lymphocytic component of medullary carcinoma of the breast. *Cancer*. 1987;59:2037-41.
- 32- Hurlimann J, Saraga P. Mononuclear cells infiltrating human mammary carcinomas: immunohistochemical analysis with monoclonal antibodies. *Int J Cancer*. 1985;35:753-62.
- 33- Eorgiannos SN, Renaut A, Goode AW, Sheaff M. The immunophenotype and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancers, the role of the major histocompatibility complex in cell-mediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicators. *Surgery*. 2003;134:827-34.
- 34- Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, et al. Tumor specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol*. 2000;165:6047-55.
- 35- Agrawal S, Marquet J, Delfau-Larue MH, Copie-Bergman C, Jouault H, Reyes F, et al. CD3 hyporesponsiveness and in vitro apoptosis are features of T cells from both malignant and nonmalignant secondary lymphoid organs. *J Clin Invest*. 1998;102:1715-23.
- 36- Lazzaro B, Anderson AE, Kajdacsy-Balla A, Hessner MJ. Antigenic characterization of medullary carcinoma of the breast: HLA-DR expression in lymph node positive cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2001;9:234-41